Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 21, No. 2, May.-Jun., 2025, p. 217-234

Investigation and Evaluation of Dually Loaded Niosomes Containing Crocin and Omega-3 by Heating & Bubble Method

P. Mardani[1] ,Gh. Rajabzadeh[1]*, B. Malaekeh-Nikouei[2], A. Bostan[1]

1- Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran (Corresponding Author Email: gh.rajabzadeh@rifst.ac.ir)
2- Pharmaceutical Technology Institue, Mashhad University of Medical Science, Mashhad, Iran

Received: 17.09.2024 Revised: 03.12.2024 Accepted: 04.12.2024 Available Online: 23.04.2025	**How to cite this article:** Mardani, P., Rajabzadeh, Gh., Malaekeh-Nikouei, B., & Bostan, A. (2025). Investigation and evaluation of dually loaded niosomes containing crocin and omega-3 by heating & bubble method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 21*(2), 217-234. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.88094.1367

Introduction

The majority of pharmaceuticals and nutraceuticals are encapsulated in various delivery vehicles in order to avoid some restrictions. This is mainly due to the molecules' physicochemical instability in physiological structure and/or their low bioavailability. Food ingredients or bioactive components can be encapsulated inside delivery systems for protection and controlled release. Encapsulated ingredients are protected from unfavorable reactions, such as lipid oxidation and volatile loss during production, storage, and handling.

Materials and Methods

Flaxseed oil was purchased from Barij Essence Pharmaceutical Co., Tehran, Iran. Saffron was bought from Novin Saffron Co., Mashhad, Iran. Cholesterol, span 60 and tween 60 were from Sigma-Aldrich. Phosphate buffered saline, sodium azide, hydrochloric acid, and other chemicals were procured from Merck (Darmstadt, Germany). All other solvents and reagents were provided from Merck Pharmaceutical Co. (Germany) as analyticall grade.

Crocin Extraction

The extraction of crocin from saffron was done based on crystallization method which has been explained by Mohajeri et.al.

Flaxseed Oil Extraction

Flaxseed is one of the richest plant sources of ω-3 fatty acids, alpha-linolenic acid (ALA, C18:3 ω-3). A Soxhlet extraction was carried out on flaxseed powder (20g) using n-hexane for 14 hours at 70°C. After extraction, the sample was concentrated in a rotary evaporator at 40°C .

Niosome Preparation

A surfactant with a HLB number between 3 - 8 is suitable for the co-encapsulation of hydrophobic and hydrophilic substances (Korani *et al.*, 2019). Hence, span 60: tween 60 variable ratios were selected to achieve HLB in this range. Additionally, the ratio of surfactants to Chol was considered variable. The DCP was applied at a constant concentration to enhance noisome stability.

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.88094.1367

Results and Discussion

Characterization of niosomes

The influence of experimental variables on the particle size, PDI and zeta potential of niosomes prepared by heating and bubble methods was investigated. In order to choose the appropriate ratios of surfactant, the physicochemical characteristics of niosomal particles, including particle size, zeta potential, PdI, and EE have been considered.

Tween 60 is a nonionic surfactant with a large hydrophilic head group and high HLB (14.9). In turn, span 60 has a large hydrophobic moiety (HLB 4.7) and low water solubility. The smaller head groups and longer alkyl chains in surfactant structure have led to larger vesicles. This might be the reason for the larger particle size of H1-H3 and B1-B3, containing higher amount of span 60 compared to other samples.

The PDI of the prepared samples was found in the range of 0.29 to 0.49. This value was considered to be within the range of sufficient for attaining stable and aggregation resistant systems. However, higher span 60 content showed comparatively a lesser degree of PDI.

Zeta potential is a respectable index of the quantity of the interaction between colloidal particles. In this work, the prepared niosomes had a zeta potential range of -31 to -48 mV, which was sufficient to maintain niosome stability without aggregation between vesicles. Negative zeta-potential in nonionic surfactant vesicles has been reported.

Based on the results, B12 and H12 samples with the span: tween ratio of 4:1 and surfactant: Chol ratio of 1:1 formed better niosomes based on particle size, PDI, EE, and zeta potential.

In the optimum conditions, the EE of crocin and ω-3 in heating method were 76% and 32%, and in bubble method they were 73% and 28%, respectively.

Stability of niosomes

The stability of the optimum niosomes prepared by bubble and heating methods were evaluated at 4°±2°C, 25±2°C, and 37°±2°C for 90 days, by means of stability in size, PDI, and EE.

Conclusion

In conclusion, this study revealed that co-encapsulation of omega3 and crocin with niosome led to better stability, slower and more controlled release profile, suggesting a promising drug delivery system.

Keywords: Bubble method, Crocin, Heating method, Niosome, Omega-3

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۲۱، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۴، ص. ۲۳۴-۲۱۷

بررسی و ارزیابی نیوزوم‌های حاوی روغن کتان و کروسین با دو روش حباب و حرارتی

پریسا مردانی[۱]- قدیر رجب زاده[۱]*- بیژن ملائکه نیکویی[۲]- آرام بستان[۱]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۴

چکیده

مطالعه حاضر به ارزیابی پایداری و خواص فیزیکوشیمیایی نیوزوم‌های حاوی کروسین و امگا۳ پرداخته است. کروسین و امگا۳ در وزیکل‌های نیوزومی مبتنی بر اسپن ۶۰ و توئین ۶۰ با استفاده از روش‌های حرارتی و حباب درون پوشانی شدند. سپس خواص فیزیکوشیمیایی، پایداری و رفتار رهایش ترکیبات حاصل ارزیابی گردید. فرآیند بهینه‌سازی بر اساس بازدهی درون پوشانی (EE)، اندازه وزیکل، پتانسیل زتا و شاخص بس پا شیدگی (PDI) انجام شد. در فرمولاسیون بهینه، بازدهی درون پوشانی کروسین و امگا۳ در روش حرارتی به‌ترتیب ۷۶٪ و ۳۲٪ با اندازه ذرات ۱۲۹ نانومتر و در روش حباب به‌ترتیب ۷۳٪ و ۲۸٪ با اندازه ذرات ۱۳۱ نانومتر بود. پتانسیل زتا برای روش حرارتی و حباب به‌ترتیب ۳۹- و ۴۵- بود. میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان داد که نیوزوم‌ها دارای ساختار کروی و وزیکلی هستند. همچنین الگوی رهایش و پایداری نیوزوم‌های بارگذاری شده در دماهای ۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پژوهش نشان داد که نانوسامانه‌های نیوزومی حاوی کروسین و امگا۳ سبب افزایش پایداری و رهایش تدریجی و کنترل شده آن‌ها می‌شود. مقایسه روش حباب و حرارتی نشان داد که نیوزوم‌های تهیه شده به روش حرارتی پارامترهای فیزیکوشیمیایی مناسب‌تری را ایجاد کرده است.

واژه‌های کلیدی: امگا۳، روش حباب، روش حرارتی، کروسین، نیوزوم

مقدمه

در سال‌های اخیر صنعت غذا به‌دنبال روش‌هایی برای درون‌پوشانی ترکیبات زیست‌فعال برای افزایش دسترسی زیستی و همچنین حفاظت از این ترکیبات در مقابل تنش‌های محیطی می‌باشد. درون‌پوشانی فرآیندی است که در آن یک ماده و یا مخلوطی از مواد توسط دیگری پوشانیده و یا به دام انداخته می‌شوند. فناوری‌های درون‌پوشانی و رهایش کنترل شده در سه دهه گذشته سریع‌ترین رشد را در صنایع ترکیبات زیست فعالسازی و پزشکی داشته است (Madene *et al*., 2019 ;Bazana *et al*., 2019). این روش موجب بهبود رسانش ترکیبات زیست فعال، افزایش حلالیت و افزایش دسترسی زیستی این ترکیبات شده است. انواع مختلفی از روش‌های درون‌پوشانی که در صنایع غذایی به کار برده می‌شود شامل لیپوزوم‌ها، فیتوزوم‌ها، نیوزوم‌ها، نانوامولسیون، نانوذرات لیپیدی جامد، حامل‌های لیپیدی نانوساختار، نانوحامل‌های پلیمری می‌باشد (Saleh *et al*., 2022; Durak *et al*., 2020; Momekova *et al*., 2021). نیوزوم‌ها وزیکل‌های سورفکتانت‌های غیریونی با ساختارهای میکروسکوپی لایه لایه هستند که از مخلوط کلسترول با این سورفکتانت‌ها در محیط آبی تهیه شده و از سامانه‌های رسانش مهم محسوب می‌شوند. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از نیوزوم‌ها جهت درون‌پوشانی مواد ترکیبات زیست‌فعال و غذایی تا حد زیادی باعث افزایش پایداری این مواد می‌گردد. همچنین این مطالعات نشان داده‌اند که نیوزوم‌ها آزادسازی کنترل شده‌ای را برای ترکیبات زیست‌فعال و مواد غذایی فراهم می‌کنند و به این ترتیب مانع از رهایش

۱- گروه نانوتکنولوژی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۲- گروه فارماسیوتیکس دانشکده داروسازی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: gh.rajabzadeh@rifst.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.88094.1367

سریع آنها می‌گردند وغلظت تجمعی آن‌ها را در بافت هدف افزایش می دهند (Tewabe *et al*., 2014; Das *et al*., 2023; Ghasemiyeh *et al*., 2019).

دانه کتان (*Linum usitatissimum* L.) یکی از قدیمی‌ترین گونه‌های زراعی می‌باشد که تا به امروز به‌دلیل روغن‌ها، فیبرها و مواد غذایی با ارزش موجود در آن بطور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. روغن کتان سرشار از امگا۳ و اسیدهای چرب لینولئیک که معمولاً ۵۵٪ از سهم روغن آن را تشکیل می‌دهد، می‌باشد. اسید آلفالینولنیک (ALA) یک اسید چرب امگا۳ است که سوبسترای بالقوه سنتز سایر اسیدهای چرب امگا۳ (ایکوزاپنتاانوئیک اسید (EPA) و دکوزاهگزاانوئیک اسید (DHA) می‌باشد. از نظر تکنیکی EPA اسید چرب ضروری نمی‌باشد، زیرا بدن می‌تواند ALA را به EPA تبدیل نماید؛ البته ضریب تبدیل ALA به EPA و DHA در بدن محدود می باشد (Kim *et al*., 2021).

زعفران از خانواده Iridaceae، گیاهی است علفی، بدون ساقه و پایا کـه در اسپانیا، فرانسه، یونان و به‌طور وسیعی در نـواحی مرکـزی و شـرق ایـران پـرورش داده مـی‌شـود. مهمترین ترکیبات موجود در کلاله گیاه زعفران عبارت‌اند از: کارتنوئیدها (ماننـد کروسـتین، کروسـین، آلفـا کاروتن، لیکوپن، زآگزانتین)، آلدئیدهای مونوترپن (ماننـد پیکروکروسـین و سـافرانال)، مونوترپنوئیـدها (مانند کروکوسانتین‌ها)، ایزوفرون‌ها و فلاوونوئیدها، کاروتنوئیدها مانند کروستین و کروسین عمده‌ترین ترکیبات ایجاد کننـده رنـگ در زعفـران مـی‌باشـند و آلدئیـدهای مونـوترپن عامـل طعـم تلـخ و مولـد بـوی زعفـران مـی‌باشـند (Vignolini *et al*., 2008). رابطه نزدیکی بین میزان کروسین کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی زعفران در چندین مقاله در شرایط برون تن گزارش شده است و این ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شده تحت تأثیر درجه گلیکوزیشین در ساختار کروسین می‌باشد. همچنین مشخص شده در چندین مکانیسم مانند توانایی گرفتن نیتریت، سرکوب کاتیون‌های رادیکالی، فعالیت شبه سوپراکسید دیسموتاز و طولانی کردن طول دوره پراکسید، شرکت می‌کند (Bathaie *et al*., 2014; Finley *et al*., 2014; Chen *et al*., 2008).

بررسی درون‌پوشانی همزمان اسکوربیک اسید با کوئرستین و گالیک اسید با کورکومین نشان داد در حالت درون‌پوشانی همزمان در هر دو مورد خصوصیات فیزیکوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی افزایش می یابد و در واقع اثر سینرژیستی باعث افزایش خصلت آنتی‌اکسیدان می‌شود (Eratte *et al*., 2014). نیوزوم حاوی کلسترول و توئین ۶۰ برای بهبود پایداری خاصیت آنتی‌اکسیدانی اپی گالوکاتچین در روده استفاده شده و مشخص گردید پایداری این آنتی‌اکسیدان با نیوزوم در روده بسیار بیشتر از حالتی است که این آنتی‌اکسیدان مستقیما درون روده تزریق شود (Liang *et al*., 2022). همچنین نتایج بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نیوزوم ساخته شده با اسپن و توئین ۶۰ به عنوان عامل حمل کننده آلفا توکوفرول و افزایش پایداری آن با استفاده از روش فیلم نازک نشان داد که نسبت ۳ به ۱ اسپن به توئین ۶۰ و مقدار ۴ میلی‌لیتر/میلی‌گرم آلفا توکوفرول بهترین شرایط برای افزایش کارایی درون‌پوشانی الفا توکوفرول می‌باشد (Basiri *et al*., 2017).

نتایج بررسی درون‌پوشانی ترکیب زیست‌فعال ایزولوسین- پرولین- پرولین در سیستم‌های رهایش لیپوزوم و نیوزوم و استفاده از آن در غنی سازی نوشیدنی نشان داد که نیوزوم پایداری بیشتری طی زمان داشته و زیست‌فراهمی بالاتری را ایجاد می‌کند (Rezvani *et al*., 2019).

همچنین نتایج بررسی درون‌پوشانی ترکیب زیست‌فعال Taxifolin در سیستم‌های رهایش لیپوزوم و نیوزوم و استفاده از آن در غنی‌سازی نوشیدنی آب سیب نشان داد که سیستم‌های وزیکولی سیستم‌های مناسبی برای درون‌پوشانی این ترکیب هستند (Hasibi *et al*., 2019) و درون‌پوشانی کروسین در نانونیوزوم و اثرات درمانی آن و بررسی ویژگی‌های آنها از جمله اندازه ذرات، پایداری، دسترسی زیستی و خاصیت عملکردی آن انجام شده است (Naderi *et al*., 2021).

در این مطالعه هدف بررسی درون‌پوشانی همزمان کروسین و امگا۳ با استفاده از نیوزوم و مقایسه روش حباب و حرارتی و انتخاب بهترین روش جهت پایداری بالاتر این ترکیبات می‌باشد.

مواد و روش‌ها

اسپن ۶۰، توئین ۶۰، کلسترول، امگا۳ و DCP از شرکت سیگما خریداری شد. برای استخراج کروسین ابتدا زعفران پودر شده با استفاده از اتانول عصاره‌گیری و سپس عصاره در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ روز جهت تشکیل کریستال‌های کروسین نگهداری و سپس با دستگاه HPLC خلوص آن اندازه‌گیری شد (خلوص ۹۰٪) (Mohajeri *et al*., 2010). و برای تهیه نیوزوم از بافر فسفات با pH ۷/۴ استفاده شد. در این طرح نسبت سورفکتانت (اسپن ۶۰ به توئین ۶۰) به یکدیگر و نسبت آن‌ها به کلسترول در ۱۸ سطح مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

بر اساس آزمایش مقسمی و حاجیزاده (Moghassemi & Hadjizadeh, 2014)، HLB یک پارامتر برای سورفکتانت‌ها است که به‌عنوان راهنمای صرفه‌جویی در زمان برای انتخاب سورفکتانت شناخته می‌شود. همچنین، مقدار HLB یک سورفکتانت نقش مهمی در کنترل کارایی درون‌پوشانی ترکیبات زیست‌فعال دارد. سورفکتانت‌هایی با عدد HLB بین ۳ تا ۸ جهت درون‌پوشانی همزمان ماده هیدروفوب و هیدروفیل مناسب می‌باشد (Moghassemi & Hadjizadeh, 2014).

جدول ۱- طرح کامل فاکتوریل در فرآیند تهیه نیوزوم در روش حباب (B) و حرارتی (H)

Table 1- Full factorial design for bubble(B) and heating (H) method

Code کد	Treatment تیمار	HLB نسبت آبدوستی به چربی دوستی	Span/Tween اسپن/ توئین	Surfactant: chol (mol ratio) نسبت مولی سورفکتانت به کلسترول
Code 1	H1 & B1	5.2	19	1:0
Code 2	H2 & B2			1:0.5
Code 3	H3&B3			1:1
Code 4	H4 & B4	5.7	9	1:0
Code 5	H5 & B5			1:0.5
Code 6	H6 & B6			1:1
Code 7	H7 & B7	6.2	5.6	1:0
Code 8	H8 & B8			1:0.5
Code 9	H9 & B9			1:1
Code 10	H10 & B10	6.7	4	1:0
Code 11	H11 & B11			1:0.5
Code 12	H12 & B12			1:1
Code 13	H13 & B13	7.3	3	1:0
Code 14	H14 & B14			1:0.5
Code 15	H15 & B15			1:1
Code 16	H16 & B16	7.7	2.3	1:0
Code 17	H17 & B17			1:0.5
Code 18	H18 & B18			1:1

سنتز نیوزوم

روش حرارتی

ابتدا سورفکتانت (اسپن ۶۰ و توئین ۶۰) با DCP در دور ۱۰۰۰ rpm و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد (دمای ذوب سورفکتانت) تحت گاز نیتروژن به‌مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد. سپس کلسترول در ظرفی جداگانه در بافر فسفات (pH ۷/۴) در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از سیستم رفلاکس به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰ هم‌زده می‌شود. ماده هیدروفوب (امگا۳) به سورفکتانت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد اضافه می‌شود. پس از اینکه دمای کلسترول به ۷۰ درجه سانتی‌گراد رسید، تحت گاز نیتروژن به این مخلوط اضافه می‌گردد. کروسین نیز در مخلوط ۳ درصد گلیسرول در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حل می‌شود و سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تحت گاز نیتروژن به مخلوط اضافه می‌گردد. سپس پس از ۶۰ دقیقه مخلوط بدون هم زدن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تحت گاز نیتروژن قرار می‌گیرد (مرحله تعادل). در مرحله بعد، مخلوط با توراکس به‌مدت ۵ دقیقه جهت همگن‌سازی هم‌زده می‌شود و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. سپس بعد از ۲۴ ساعت جهت کاهش ابعاد

نیوزوم‌ها از تیمار اولتراسوند به‌مدت ۷ دقیقه (۱ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) با شدت ۷۰ ٪ استفاده شد (Mozafari *et al.*, 2002).

روش حباب

ابتدا سورفکتانت‌ها (اسپن ۶۰ و توئین ۶۰) با DCP و امگا۳ با اولترا توراکس مدل ULTRA-TURRAX® basic T۱۰ ساخت شرکت IKAآلمان با دور ۱۵۰۰۰ در داخل بالن سه دهانه به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق همزده می‌شوند. سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و تحت گاز نیتروژن سایر مواد شامل کلسترول و کروسین (همراه با گلیسرول ۳ درصد) که قبلا جداگانه به‌ترتیب در دمای ۱۲۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه حل شده‌اند، اضافه می‌گردند. پس از ۶۰ دقیقه مخلوط بدون همزدن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تحت گاز نیتروژن قرار می گیرد. (مرحله تعادل) و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. جهت کوچک نمودن سایز نیوزوم‌ها از تیمار اولتراسوند به‌مدت ۷ دقیقه (۱ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) با شدت ۷۰ ٪ استفاده شد (Yeo *et al*., 2017).

تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا نیوزوم‌ها

اندازه ذرات به‌وسیله دستگاه پارتیکل سایزر مدل Bettersizer ST صورت پذیرفت صورت می‌پذیرد. قطر هیدرودینامیک و توزیع اندازه ذرات نیوزوم پس از رقیق کردن نمونه به میزان ۱۰ برابر با بافر فسفات به روش تفرق نور پویا توسط Zetasizer Nano ZS انجام می‌شود. پتانسیل زتا توسط دستگاه Zetasizer Nano ZS به روش Laser Doppler Micro-electrophoresis انجام می‌گیرد. نیوزوم‌ها توسط بافر فسفات (pH= ۷/۴، ۵۰ Mm) به میزان ۱۰ برابر رقیق شده و مورد ارزیابی قرار گرفت (Naderi *et al*., 2021).

کارایی درون‌پوشانی

بررسی کارایی درون‌پوشانی کروسین

برای بررسی مقدار کروسین کپسوله شده، سوسپانسیون‌های حاوی نانوذره با سرعت ۸۰۰۰ rpm به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ (مدل Hettich) شد و کروسین موجود در سوپرناتانت با استفاده از دستگاه HPLC تعیین مقدار و براساس فرمول ذیل میزان کروسین درون‌پوشانی شده محاسبه گردید.

(۱)

$$EE\ (\%) = [(\text{Amount of initial crocin} - \text{Amount of crocin in free supernatant})/\text{Amount of initial crocin}] \times 100$$

بررسی کارایی درون‌پوشانی امگا ۳

برای اندازه‌گیری میزان امگا۳ درون‌پوشانی شده یک میلی‌لیتر از محلول نیوزومی داخل کیسه دیالیز ۱۲ کیلو دالتون فعال شده ریخته شد و بعد از بسته شدن دو انتها، کیسه دیالیز داخل ۲۰۰ میلی‌لیتر مخلوط آب–اتانول (با نسبت ۵۰:۵۰) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت (شیکر اینکوباتور) گذاشته و سپس با ایزوپروپانول دیواره را شکسته و میزان امگا۳ درون پوشانی شده با استفاده از گازکروماتوگرافی تعیین مقدار شد.

(۲)

$$EE(\%) = (\text{omega3 concentration in the dialysis bag}/\text{Initial omega3 concentration})\times 100$$

بررسی پایداری نیوزوم‌ها

برای بررسی پایداری نیوزوم‌ها، نمونه‌ها در ویال‌های شیشه‌ای پوشانده شده با پارافیلم در یخچال (با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد)، محیط اتاق (با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و آون (با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. سپس بعد از ۹۰ روز تغییرات اندازه ذرات و درصد درون‌پوشانی به‌عنوان شاخص‌های پایداری بررسی گردید (Naderi *et al*., 2021).

بررسی رهایش

رهایش ترکیبات زیست‌فعال در شرایط آزمایشگاهی اغلب با استفاده از یک محلول آزمایشی ایجاد می‌شود که شرایط مختلف فیزیولوژیکی را منعکس می‌کند، و می‌تواند کیفیت، کارایی و پایداری محصولات را ارزیابی کند. به‌منظور شبیه‌سازی شرایط معده و روده، پروفایل‌های رهایش در این دو محیط مورد ارزیابی قرار گرفتند و نمودارهای کالیبراسیون دراین دو محیط بافری رسم گردید و میزان ترکیبات زیست‌فعال تعیین مقدار گردید.

به‌منظور بررسی رهایش ترکیبات زیست‌فعال از نیوزوم‌ها، آزادسازی کروسین در محلول معده (pH ۱/۲، Pepsin ۰/۳۲ w/v، HCl ۰/۱M) و روده (KH_2PO_4، Pancreatin ٪۱، pH ۷/۴) با استفاده از کیسه دیالیز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. مقدار مناسبی از ترکیبات زیست‌فعال در کیسه دیالیز (D۰۶۵۵، سیگما، کانادا) با قطع ۱۲/۴ کیلو دالتون ریخته شد. سپس کیسه‌ها به‌مدت ۲ ساعت در ۵۰ میلی‌لیتر بافر معده قرار داده شدند و سپس به‌مدت ۶ ساعت در ۶۰ میلی‌لیتر از محیط شبیه‌سازی روده قرار گرفتند و سپس ترکیبات زیست‌فعالی آزاد شده تعیین مقدار شد. همچنین برای اندازه‌گیری میزان رهایش امگا۳، ۵ میلی‌لیتر از محلول نیوزوم در محیط شبیه‌سازی شده روده و معده قرار گرفت و این محلول در دمای ۳۷ درجه با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه در شیکر اوربیتالی قرار داده شد و در فواصل زمانی معین

نمونه‌برداری انجام گرفت و میزان امگا۳ با دستگاه GC تعیین مقدار گردید (Korani *et al.*, 2019).

مورفولوژی ذرات نیوزومی

شکل و اندازه نیوزوم‌های حاوی امگا۳ و کروسین با رنگ‌آمیزی منفی توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری مطابق روش مشرقی و همکاران (Mashreghi *et al.*, 2020) مشاهده شد. پس از قرار دادن سوسپانسیون رقیق شده با بافر فسفات، با گلوترآلدئید ۲/۵ درصد تثبیت می‌شود. سپس نمونه تثبیت شده با محلول آبی یورانیل استات ۲ درصد به‌مدت ۲ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و محلول باقی‌مانده توسط فیلتر کاغذی جدا و در پایان، تصویر نمونه خشک شده توسط میکروسکوپ الکترونی دارای ولتاژ ۱۲۰kv گرفته می‌شود (Mashreghi *et al.*, 2020).

پایداری اکسایشی

ابتدا عدد پراکسید مطابق روش AOCS شماره ۵۳–۸Cd، و سپس تیوباربیتوریک اسید مطابق روش AOCS شماره ۱۹Cd–۹۰ برای امگا۳ آزاد، امگا۳ درون‌پوشانی شده در نیوزوم و درون‌پوشانی هم زمان کروسین و امگا۳ در نیوزوم به‌مدت سه هفته بررسی شد (Horwitz, 2004).

روش آنالیز داده‌ها

در این مطالعه از طرح فاکتوریل کامل برای بررسی تأثیر سه عامل بررسی شده بر روی درصد کارایی درون‌پوشانی نیوزوم‌های حاوی امگا۳ و کروسین، سایز ذرات، PDI و پتانسیل زتا استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری تفاوت بین تیمارهای مختلف با استفاده از تحلیل واریانس و مقیاس میانگین (ANOVA) انجام شد. سطح احتمال ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نرم‌افزار SPSS ۱۶ (آزمون دانکن) در نظر گرفته شد. همه ارقام با نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۶ ترسیم شدند.

نتایج و بحث

اندازه ذرات، پتانسیل زتا و کارایی درون‌پوشانی

همانطور که در نتایج جداول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود اندازه ذرات H1-H3 و B1-B3 که حاوی مقدار بیشتری از اسپن ۶۰ در مقایسه با فرمولاسیون‌های دیگر می‌باشند، بیشتر است. به خوبی ثابت شده است که اندازه نیوزوم‌ها به طول زنجیره آلکیل سورفکتانت‌ها بستگی دارد. سورفکتانت‌ها با زنجیره‌های آلکیل طولانی‌تر معمولاً وزیکول‌های بزرگ‌تری ایجاد می‌کنند مقادیر بیشتر اسپن ۶۰ نیز نسبتاً درجه کمتری از پراکندگی را نشان داد. PDI در محدوده ۰/۲۹ تا ۰/۴۱ یافت شد که محدوده مناسب برای محصولات ترکیبات زیست‌فعال می‌باشد (Danaei *et al.*, 2018).

در تمام فرمول‌های نیوزومی در این مطالعه با بار منفی تهیه شد و تفاوت معنی‌داری بین بار سطحی نیوزوم‌های بهینه ساخته شده به روش حرارتی (پتانسیل زتا: ۳۹- میلی‌ولت) و نیوزوم‌های بهینه ساخته شده به روش حباب (پتانسیل زتا: ۴۵- میلی‌ولت) مشاهده نگردید (Yamamoto *et al.*, 2001).

نتایج جداول ۲ و ۳ می‌دهد که افزایش نسبت توین ۶۰ در مخلوط سورفکتانت، کلسترول نقش عمده‌ای در افزایش کارایی درون‌پوشانی دارد. نتایج نشان می‌دهد که فرمول‌های مبتنی بر توئین، کارایی درون پوشانی بالاتری برای ترکیبات زیست‌فعالی آب‌دوست دارند و همچنین نیوزوم‌های مبتنی بر اسپن ۶۰ عملکرد خوبی برای به دام انداختن ترکیبات زیست‌فعال آبگریز دارند. بنابراین، تعادل مناسب سورفکتانت‌ها برای همپوشانی مواد آب‌دوست و آبگریز ضروری است. مولکول‌های آمفوفیل که دارای هر دو گروه آب‌دوست و آبگریز بالا هستند، می‌توانند غشای مستحکمی تشکیل دهند. نیوزوم‌های ساخته شده با اسپن ۶۰ توبین ۶۰ و کلسترول غشایی مناسب تری را تشکیل می‌دهد که دارای چگالی بالاتر، نفوذپذیری کمتر و نشتی کمتر بوده و منجر به کارایی درون پوشانی بالاتر می‌شود (Nandhakumar *et al.*, 2017).

همانطور که در بالا ذکر شد، اسپن ۶۰ با بخش آبگریز نسبتاً بزرگ می‌تواند یک ساختار وزیکول در محلول‌های آبی رقیق تشکیل دهد. در مقابل، توبین ۶۰ با HLB بالاتر نمی‌تواند وزیکول ایجاد کند و برخی از مواد افزودنی مانند کلسترول برای دستیابی به هندسه مولکولی مناسب برای تشکیل وزیکول دولایه ضروری است.

نتایج جدول ۲ و ۳ نشان می‌دهد درصد کارایی درون‌پوشانی با افزایش نسبت اسپن به توئین افزایش می‌یابد، طول زنجیره آلکیل در سورفکتانت عامل مهمی است که بر کارایی درون‌پوشانی تأثیر می گذارد، در واقع این عامل بر HLB سورفکتانت تأثیر می‌گذارد. کارایی درون پوشانی بالا، فراهمی زیستی مواد مغذی را تضمین می‌کند. به منظور دستیابی به راندمان درون‌پوشانی بالا، دو عامل در سطوح مختلف شامل ماهیت و نسبت سورفکتانت‌ها و کلسترول مورد ارزیابی و بهینه سازی قرار گرفت. برخی از محققان مشاهده کردند که کارایی درون پوشانی تا حد زیادی تحت تأثیر نوع و محتوای سورفکتانت‌ها قرار می گیرد و گزارش کردند که افزایش طول زنجیره آلکیل منجر به کارایی بالاتر درون‌پوشانی می‌شود از این رو، سیستم‌هایی با ترکیبی از جفت سورفکتانت‌ها، قدرت امولسیون‌کنندگی بالا و غلظت بالا ممکن است نتایج بهتری در کارایی درون‌پوشانی ارائه دهند (Nandhakumar *et al.*, 2017).

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ذرات نیوزومی تهیه شده به روش حرارتی

Table 2- Physicochemical properties of noisomes prepared by heating method

Code کد	HLB نسبت آبدوستی به چربی دوستی	Particle Size اندازه ذرات	PDI ضریب پراکندگی ذرات	EE of Crocin درصد درون‌پوشانی کروسین	EE of Omega3 درصد درون‌پوشانی امگا۳	Zeta potential پتانسیل زتا
1		350.1±0.3^{a}	0.41±0.005^{a}	20±0.32^{a}	55±0.25^{a}	-31±1.2^{a}
2	5.2	389.6±0.3^{b}	0.45±0.005^{a}	18±0.33^{a}	52±0.21^{a}	-38±1.2^{b}
3		321.0±0.3^{c}	0.44±0.005^{a}	23±0.32^{a}	58±0.22^{a}	-34±1.2^{a}
4		303.1±0.3^{d}	0.37±0.005^{b}	34±0.34^{b}	51±0.24^{a}	-37±1.2^{b}
5	5.7	348.2±0.3^{a}	0.33±0.005^{b}	30±0.33^{b}	49±0.22^{a}	-40±1.2^{b}
6		299.9±0.3^{d}	0.35±0.005^{b}	35±0.36^{b}	53±0.23^{a}	-42±1.2^{b}
7		245.6±0.3^{e}	0.33±0.005^{b}	45±0.37^{c}	48±0.26^{a}	-39±1.2^{b}
8	6.2	278.0±0.3^{d}	0.39±0.005^{b}	41±0.32^{c}	35±0.24^{b}	-44±1.2^{b}
9		230.1±0.3^{e}	0.35±0.005^{b}	52±0.31^{d}	44±0.22^{b}	-45±1.2^{b}
10		118.4±0.3^{f}	0.30±0.005^{c}	53±0.36^{d}	29±0.23^{c}	-30±1.2^{a}
11	6.7	169.7±0.3^{g}	0.39±0.005^{b}	42±0.38^{c}	25±0.23^{c}	-41±1.2^{b}
12		129.1±0.3^{f}	0.20±0.005^{d}	76±0.32^{e}	32±0.21^{c}	-39±1.2^{b}
13		149.8±0.3^{h}	0.26±0.005^{d}	69±0.31^{f}	29±0.26^{c}	-43±1.2^{b}
14	7.3	159.3±0.3^{h}	0.3±0.005^{c}	64±0.37^{f}	25±0.21^{c}	-45±1.2^{c}
15		132.2±0.3^{f}	0.33±0.005^{b}	70±0.35^{f}	31±0.26^{c}	-43±1.2^{b}
16		123.5±0.3^{f}	0.3±0.005^{c}	73±0.35^{e}	25±0.23^{c}	-44±1.2^{b}
17	7.7	131.3±0.3^{f}	0.29±0.05^{c}	71^{e}	19^{d}	-48±1.2^{c}
18		115.6±0.3^{f}	0.34±0.05^{b}	77^{e}	25^{c}	-46±1.2^{c}

جدول ۳- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ذرات نیوزومی تهیه شده به روش حباب

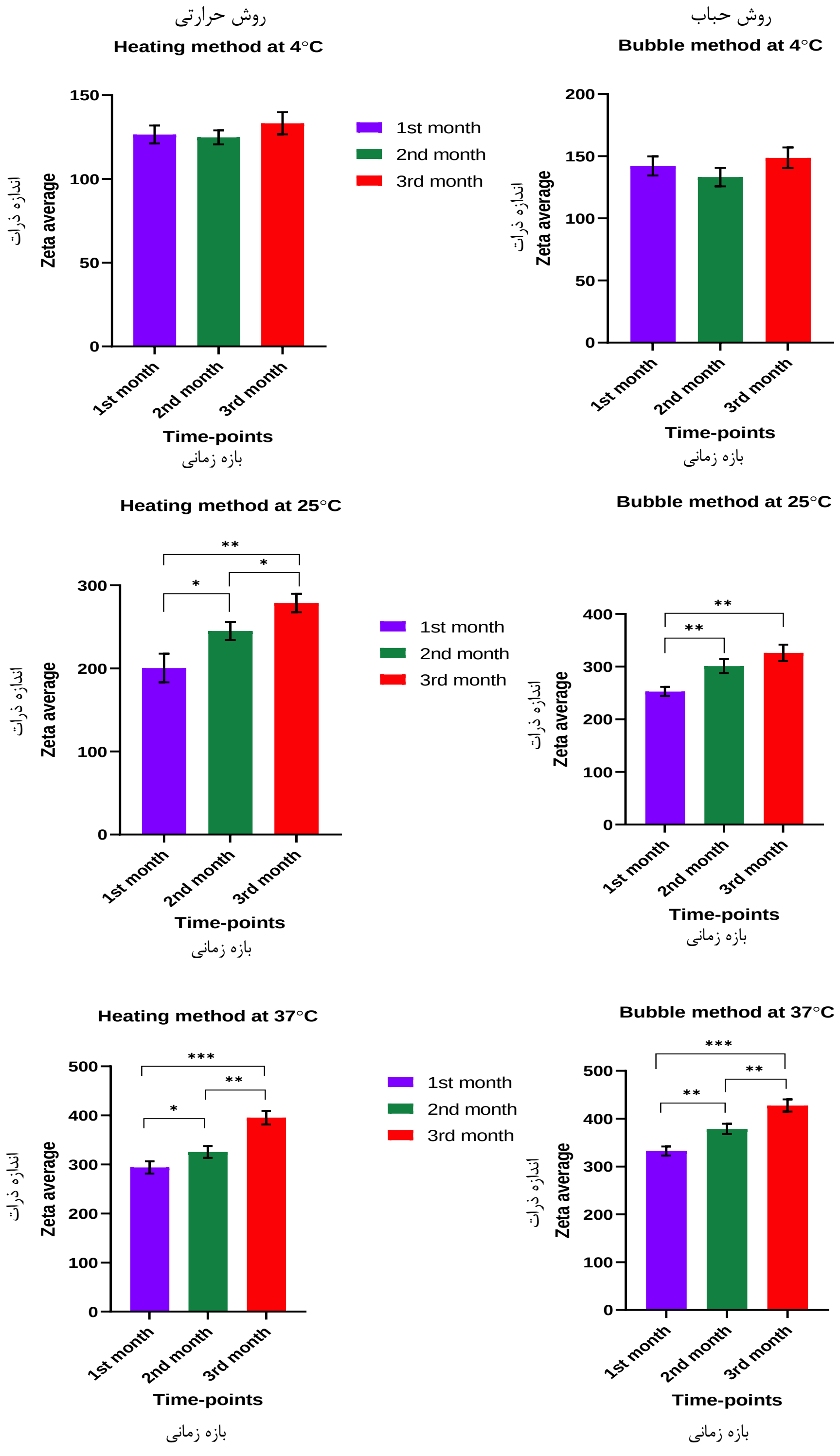
Table 3- Physicochemical properties of noisomes prepared by bubble method

Code کد	HLB نسبت آبدوستی به چربی دوستی	Particle Size اندازه ذرات	PDI ضریب پراکندگی ذرات	EE of Crocin درصد درون‌پوشانی کروسین	EE of Omega3 درصد درون‌پوشانی امگا۳	Zeta potential پتانسیل زتا
1		352.1±0.3^{a}	0.41±0.005^{a}	22±0.25^{a}	51±0.20^{a}	-35±1.2^{a}
2	5.2	389.6±0.3^{b}	0.45±0.005^{a}	19±0.31^{a}	55±0.21^{a}	-31±1.2^{a}
3		326±0.3^{c}	0.4±0.005^{a}	28±0.24^{a}	53±0.22^{a}	-32±1.2^{a}
4		303.1±0.3^{d}	0.49±0.005^{a}	31±0.27^{b}	50±0.22^{a}	-33±1.2^{a}
5	5.7	345±0.3^{a}	0.48±0.005^{a}	30±0.30^{b}	49±0.18^{b}	-28±1.2^{b}
6		300±0.3^{d}	0.44±0.005^{a}	37±0.27^{b}	52±0.18^{a}	-30±1.2^{b}
7		245.6±0.3^{e}	0.36±0.005^{b}	44±0.24^{c}	49±0.23^{b}	-39±1.2^{a}
8	6.2	276±0.3^{f}	0.39±0.005^{b}	41±0.24^{c}	35±0.17^{c}	-41±1.2^{c}
9		234.1±0.3^{e}	0.41±0.005^{a}	52±0.27^{d}	46±0.20^{b}	-41±1.2^{c}
10		118.4±0.3^{g}	0.30±0.005^{b}	55±0.23^{d}	31±0.24^{c}	-30±1.2^{b}
11	6.7	169.7±0.3^{h}	0.39±0.005^{b}	42±0.27^{c}	25±0.23^{d}	-41±1.2^{c}
12		131.2±0.3^{g}	0.21±0.005^{c}	73±0.24^{e}	28±0.18^{d}	-45±1.2^{c}
13		148.3±0.3^{h}	0.22±0.005^{c}	64±0.27^{f}	29±0.18^{d}	-43±1.2^{c}
14	7.3	159.3±0.3^{h}	0.29±0.005^{c}	62±0.21^{f}	27±0.21^{d}	-44±1.2^{c}
15		131.2±0.3^{g}	0.31±0.005^{b}	70±0.25^{e}	31±0.19^{c}	-45±1.2^{c}
16		123±0.3^{g}	0.33±0.005^{b}	71±0.23^{e}	25±0.18^{d}	-41±1.2^{c}
17	7.7	133.3±0.3^{g}	0.30±0.005^{b}	72±0.24^{e}	19±0.21^{e}	-45±1.2^{c}
18		125±0.3^{g}	0.29±0.005^{c}	73±0.23^{e}	22±0.19^{d}	-46±1.2^{c}

جدول ٤- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ذرات نیوزومی بهینه

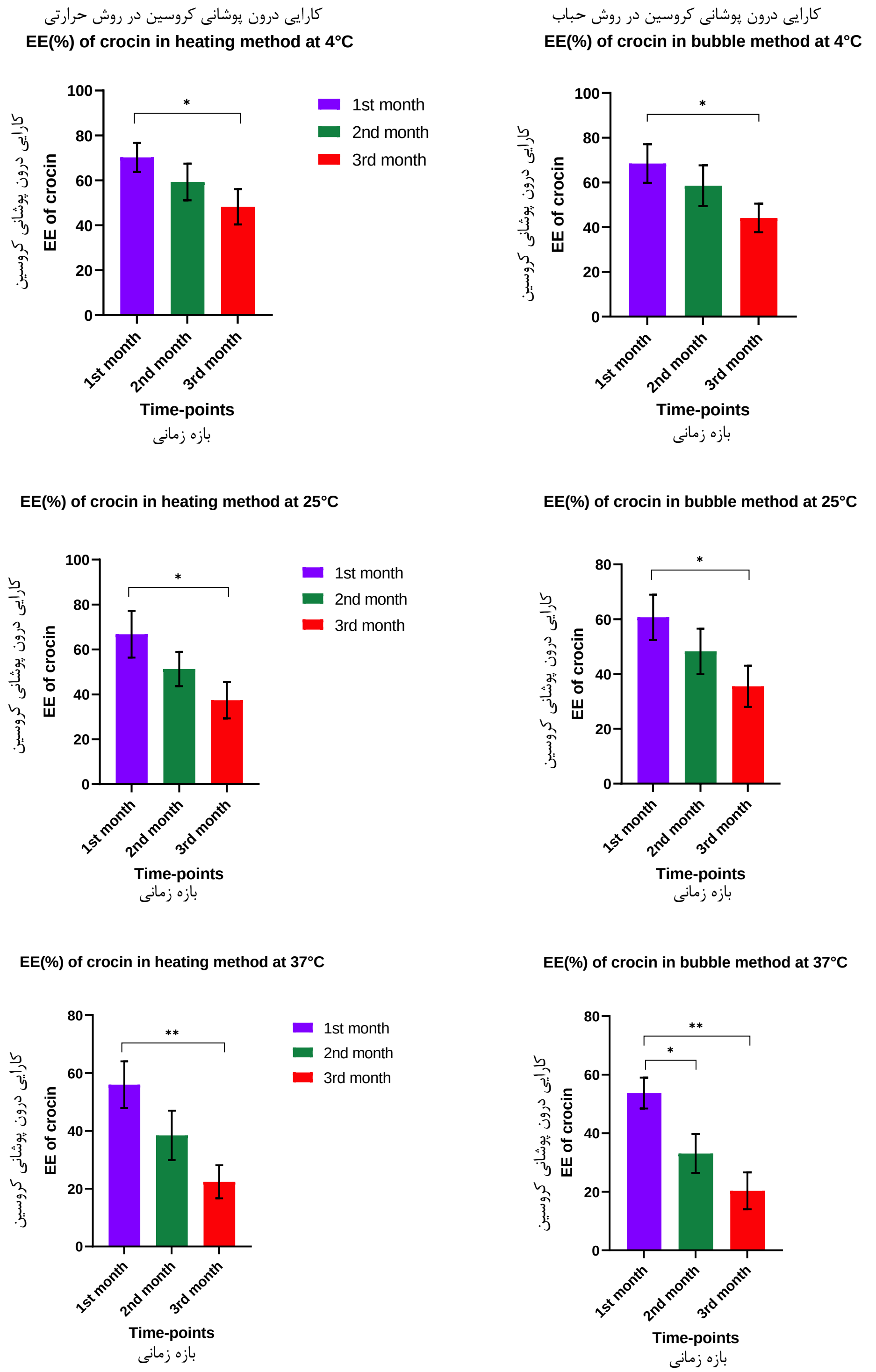
Table 4- Physicochemical properties of optimal noisome

Code کد	(span/tween): chol نسبت سورفکتانت به کلسترول	Producing method روش تولید	Particle size اندازه ذرات	PDI ضریب پراکندگی ذرات	EE of Crocin درصد درون‌پوشانی کروسین	EE of Omega3 درصد درون‌پوشانی امگا۳	Zeta potential پتانسیل زتا
Code 12	(4:1)	Heating	129.1±0.3^{f}	0.20±0.005^{d}	76±0.32^{e}	32±0.21^{c}	-39±1.2^{b}
Code 12	(4:1)	Bubble	131.2±0.3^{g}	0.21±0.005^{c}	73±0.24^{e}	28±0.18^{d}	-45±1.2^{c}



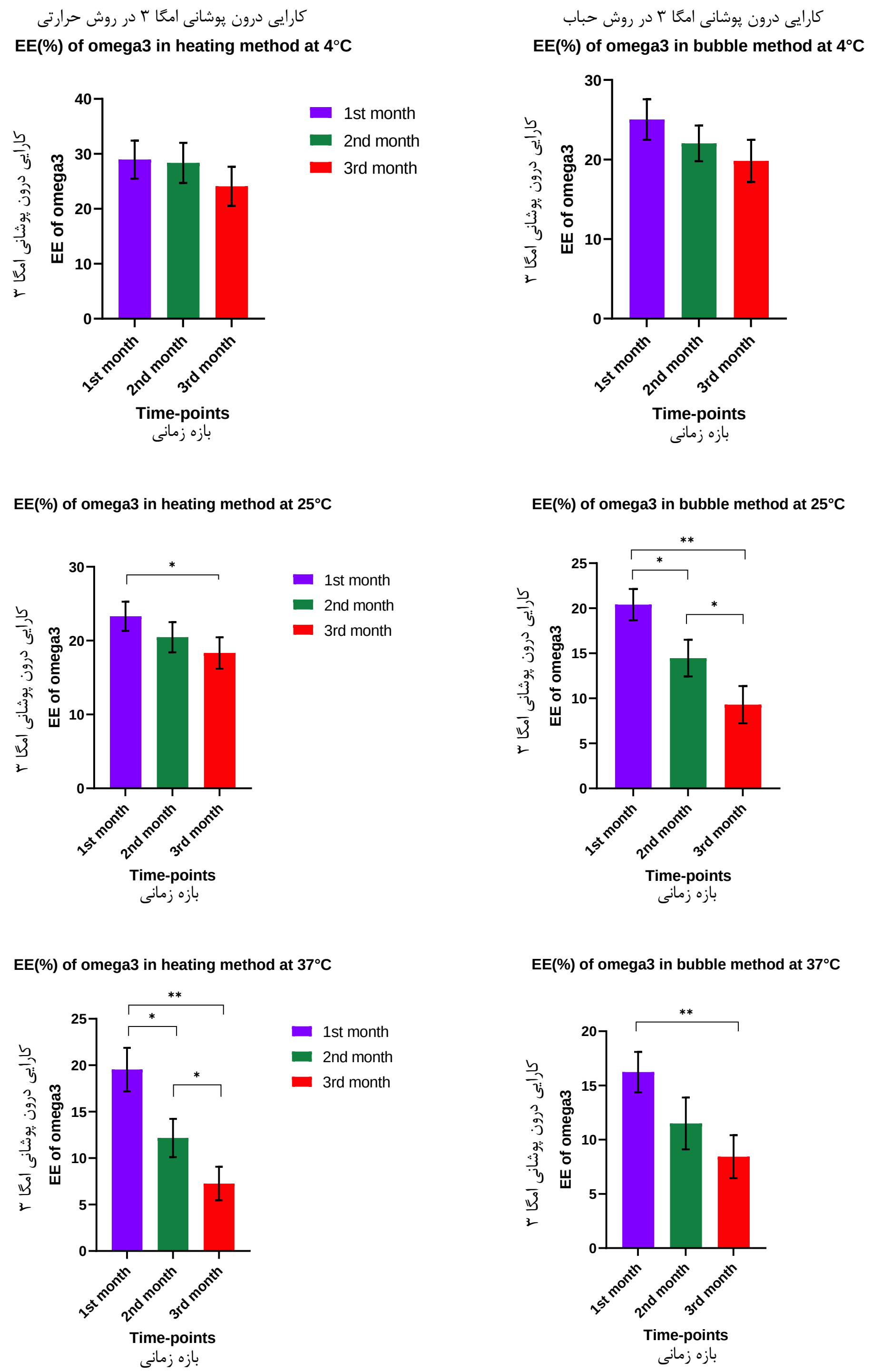
شکل ۱- مقایسه میانگین اندازه ذرات در دو روش حباب و حرارتی در طی زمان

Fig. 1. Comparison of Particle Size of Bubble and Heating method by the time



شکل ۲- مقایسه کارایی درون پوشانی کروسین در دو روش حباب و حرارتی در طول زمان

Fig. 2. Comparison of encapsulation efficiency of crocin with Bubble and Heating method by the time



شکل ۳- مقایسه کارایی درون پوشانی امگا۳ در دو روش حباب و حرارتی در طول زمان

Fig. 3. Comparison of encapsulation efficiency of omega3 Bubble and Heating method during the time

با توجه به جدول ۴، در روش حباب و حرارتی نمونه‌ای با بالاترین درصد درون‌پوشانی، و کمترین اندازه ذرات و پتانسیل زتا منفی انتخاب گردید.

بررسی پایداری ذرات نیوزومی

با توجه به شکل ۱ میزان پایداری ذرات نیوزومی بهینه تهیه شده به دو روش حباب و حرارتی، بر حسب کارایی درون‌پوشانی کروسین و امگا۳ در طی ۳ ماه در دماهای ۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید. همانطور که مشاهده می‌شود، پایداری ذرات ساخته شده با افزایش دما و همچنین زمان کاهش می‌یابد. همچنین با توجه به کارایی درون‌پوشانی کروسین و امگا۳ در شکل‌های ۲ و ۳، ذرات ساخته شده به روش حرارتی در تمام شرایط دارای پایداری بهتر و تغییرات کمتر می‌باشند.

همچنین خصوصیات فیزیکوشیمیایی ذرات در طی ۳ ماه و تحت دماهای مختلف، روند تغییرات اندازه ذرات در شکل ۱ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تغییرات قابل توجهی نداشتند و نسبتاً پایداری خود را حفظ کردند. اما در دماهای بالاتر، روند تغییرات اندازه ذرات به‌صورت قابل توجهی افزایشی بود.

بررسی رهایش

مطالعه رهایش کروسین و امگا۳ در شرایط آزمایشگاهی برای ارزیابی کیفیت، کارایی و پایداری محصول در شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش انجام شد. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، رهایش کروسین و امگا۳ در شرایط معده شیب بیشتری دارد که ممکن است به گرادیان غلظت اولیه نسبت به شرایط اسیدی نسبت داده شود. یافته‌های مشابهی در سایر وزیکول‌های نیوزومی حاوی دیاسرئین و کلاریترومایسین مشاهده شده است (Shilakari Asthana, Sharma & Asthana, 2016).

میزان آزادسازی کمتر امگا۳ به ماهیت آبگریز آن و کاهش نیروی محرکه برای انتشار نسبت داده می‌شود. این روند به موازات نتایج سایر مواد آبگریز مانند تیاکسولون، نالترکسون HCl و کافئین است (Chen *et al*., 2017; Khazaeli, Pardakhty & Shoorabi, 2007; Parizi *et al*., 2019).

همبستگی بین انتشار در شرایط آزمایشگاهی و داده‌های پایداری نشان می‌دهد که پایداری بالا منجر به پروفایل انتشار کندتر می‌شود. وجود Chol و اسپن و توئین ۶۰ در ساختار نیوزوم به پایداری بالای غشا کمک می‌کند. درون‌پوشانی کروسین و امگا۳ در نیوزوم اجازه می‌دهد تا در یک دوره طولانی مدت باعث آزادسازی پایدار و کنترل شده گردیده و پایداری سوسپانسیون را در طول ذخیره‌سازی تضمین کند. مقایسه بین روش‌های حباب و حرارتی نشان داد که نمونه‌های به‌دست‌آمده از روش حرارتی رهاسازی پایدارتری را نشان می دهند (Farzaneh *et al*., 2018; Pamunuwa *et al*., 2016).

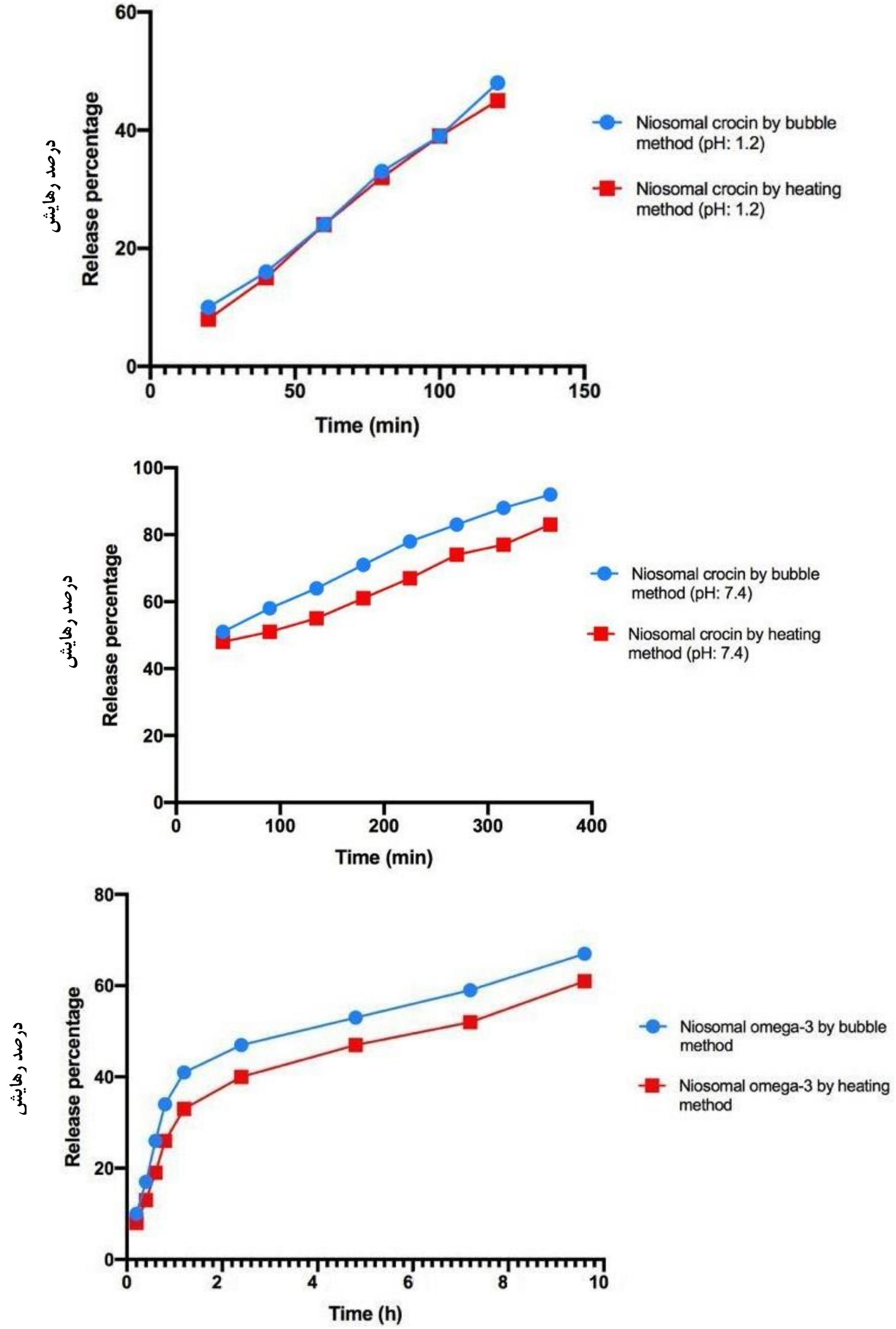
میکروسکوپ الکترونی TEM

تصاویر میکروسکوپ الکترونی که در شکل ۵ نشان داده شده است تأیید می‌کند که فرمولاسیون‌های نیوزومی بهینه به دو روش حباب و حرارتی تقریباً یکنواخت و کروی شکل با اندازه‌های حدود ۲۰۰ نانومتر است که با نتایج DLS سازگار است (Gaafar *et al*., 2014).

پایداری اکسایشی

به‌منظور اندازه‌گیری پایداری اکسایشی، مقدار پراکسید و تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شدند. بدین منظور، مقدار پراکسید ولیو بر اساس پروتوکل AOAC بر حسب میلی‌اکی‌والان اکسیژن در هر کیلوگرم به‌ترتیب در امگا۳، ذرات نیوزومی حاوی امگا۳ به تنهایی و همراه با کروسین در سه هفته متوالی در دمای ۴ درجه اندازه‌گیری شدند. با توجه به شکل ۶ در هفته اول مقدار پراکسید ولیو در تمامی فرمول‌ها تقریباً ۰٫۶ می‌باشد که در هفته‌های بعد دارای یک روند افزایشی است. به‌طور کلی در تمامی هفته‌ها، این مقدار برای ذرات انکپسوله شده در نیوزوم حاوی کروسین و امگا۳ کمترین و برای امگا۳ آزاد بیشترین می‌باشد. در هفته آخر مقدار پراکسید به بالاترین میزان خود رسیده است. همچنین، این روند افزایشی در مقدار تیوباربیتوریک اسید همانند پراکسید در ۳ هفته متوالی می‌باشد. در هفته آخر نیز مقدار تیوباربیتوریک اسید در بالاترین میزان بوده است. نتایج نشان می‌دهد درون‌پوشانی همزمان کروسین به همراه امگا۳ به‌دلیل اثر آنتی‌اکسیدانی کروسین و ساختار کارتنوئیدی آن که امکان به دام انداختن رادیکال های آزاد را دارد و در قسمت مقدمه به آن اشاره شده است، در افزایش پایداری ترکیبات اولیه و ثانویه اکسیداسیون نقش دارد و باعث محافظت امگا۳ در مقابل اکسیداسیون می‌شود. آزمون پایداری اکسایشی نیز نشان داد که در روز اول، همه نمونه‌ها سطح اکسیداسیون پایینی داشتند. سپس مقدار پراکسید (PV) در همه نمونه‌ها در طول نگهداری در دمای ۴ درجه افزایش یافته است.

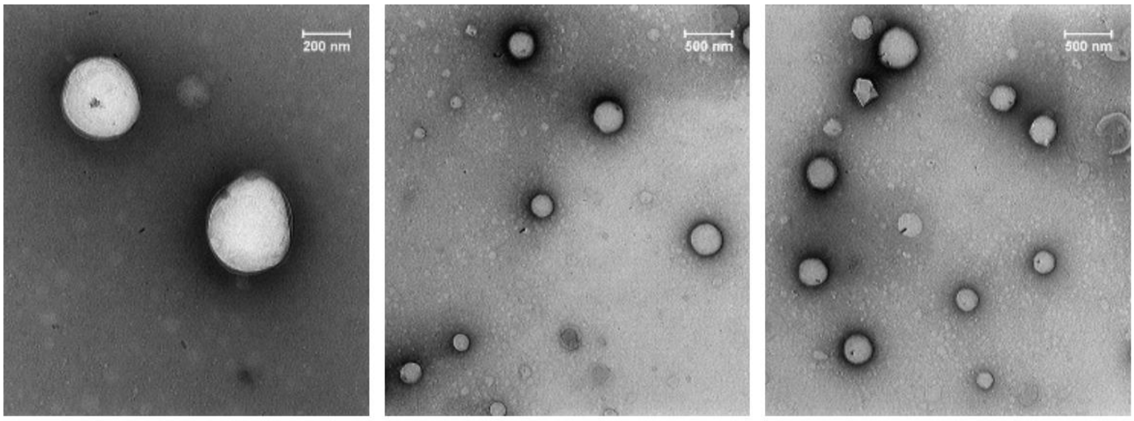
همچنین، تفاوت معنی‌داری در مقدار TBA بین امگا۳ آزاد و فرمول نیوزومال در طول ذخیره‌سازی مشاهده شد که نشان‌دهنده نقش حفاظتی نیوزوم در برابر اکسیداسیون در طی ۲۱ روز نگهداری می‌باشد.



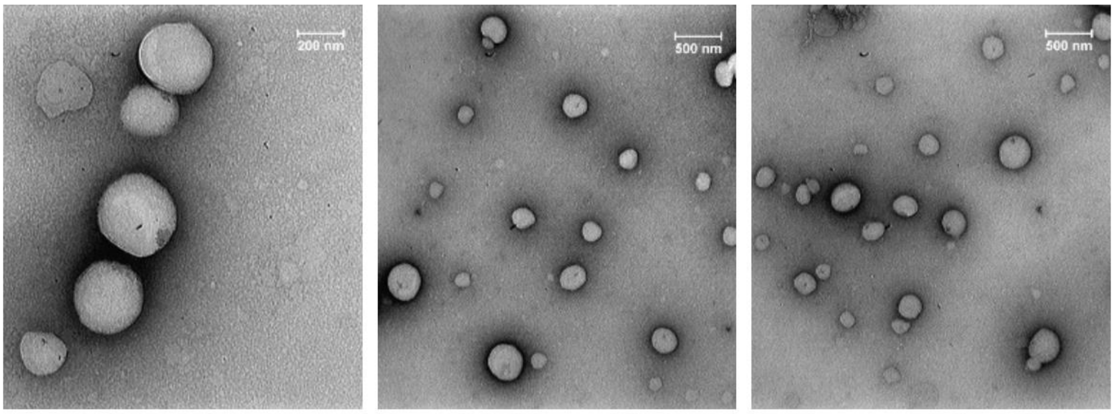
شکل ٤- پروفایل رهایش کروسین و امگا۳ در محیط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

Fig. 4. Release profile of crocin and omega3 in simulated gastrointestinal fluid

(A) (الف)

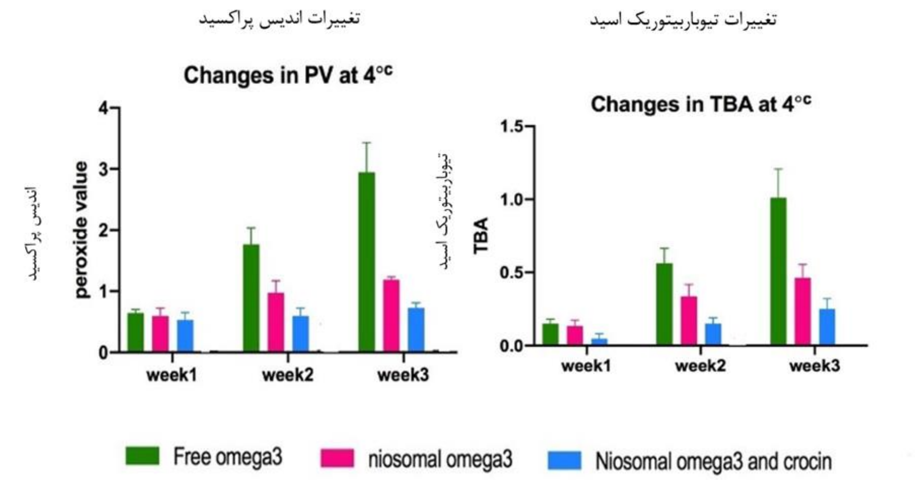


(B) (ب)



شکل ۵- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نیوزوم‌های تهیه شده به روش حرارتی (الف) و روش حباب (ب)

Fig. 5. TEM image of noisome prepared by heating (A) and bubble method (B)



شکل ٦- تغییرات اندیس پراکسید و تیوباربیتوریک اسید نموته ها در طی سه هفته

Fig. 6. Variation of PV and TBA over three weeks

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که کروسین و امگا۳ درون‌پوشانی شده در نیوزوم تهیه شده به روش حرارتی پایداری بیشتری نسبت به روش حباب دارند و این تکنیک می‌تواند به‌عنوان یک روش کارآمد در افزایش پایداری این‌گونه محصولات در شرایط نامساعد و تنش‌های محیطی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین یافته‌ها نشان می‌دهد شرایط دمایی بهینه نگهداری ذرات نیوزومی ساخته شده ۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

علاوه بر این درون‌پوشانی همزمان کروسین و امگا۳ در بهبود پایداری اکسایشی و جلوگیری از ترکیبات اولیه و ثانویه نیز نقش مؤثری دارد. همچنین الگوی رهایش امگا۳ و کروسین درون‌پوشانی شده در هر دو روش به‌صورت تدریجی و کنترل شده می‌باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

میزان مشارکت نویسندگان

پریسا مردانی: انجام آزمایشات، تحقیق و بررسی، روش‌شناسی، مدیریت داده‌ها، نگارش پیش‌نویس؛ **قدیر رجب زاده:** مدیریت پروژه، مدیریت داده‌ها، نظارت و نگارش؛ **بیژن ملائکه:** نظارت پروژه؛ **آرام بستان:** بررسی و ویرایش.

منابع تأمین مالی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری خانم پریسا مردانی با شماره مصوبه ۷۱۲۹۶۰۱۲ بوده و منابع مالی آن توسط موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی تأمین شده است.

سپاسگزاری

به این وسیله از مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی در حمایت از این رساله قدردانی می‌گردد.

References

1. Basiri, L., Rajabzadeh, G., & Bostan, A. (2017). Physicochemical properties and release behavior of Span 60/Tween 60 niosomes as vehicle for α-Tocopherol delivery. *LWT*, *84*, 471–478. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.009
2. Bathaie, S.Z., Farajzade, A., & Hoshyar, R. (2014). A review of the chemistry and uses of crocins and crocetin, the carotenoid natural dyes in saffron, with particular emphasis on applications as colorants including their use as biological stains. *Biotechnology Histochemicaly*, *89*, 401–411. https://doi.org/10.3109/10520295. 2014.890741
3. Bazana, M. T., Codevilla, C. F., & de Menezes, C. R. (2019). Nanoencapsulation of bioactive compounds: Challenges and perspectives. *Curr Opin Food Sci.*, *26*, 47–56. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.005
4. Chen, F., Liang, L., Zhang, Z., Deng, Z., Decker, A.E., & McClements, D.J. (2017). Inhibition of lipid oxidation in nanoemulsions and filled microgels strengthened with omega-3 fatty acids using casein as a Natural Antioxidant. *Journal Food Hydrology*, *63*, 240–248. https://doi.org/ 10.1016/j.foodhyd.2016.09.001
5. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., & Dokhani, A. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, *10*, 57. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057
6. Das, A., Ringu, T., Ghosh, S., & Pramanik, N. (2023). A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers. *Polymer Bulletin*, *80*, 7247-7312. https://doi.org/10.1007/s00289-022-04443-4
7. Durak, S., Esmaeili Rad, M., Alp Yetisgin, A., Eda Sutova, H., Kutlu, O., Cetinel, S., & Zarrabi, A. (2020). Niosomal drug delivery systems for ocular disease—recent advances and future prospects. *Nanomaterials*, *10*, 1191. https://doi.org/10.3390/nano10061191
8. Eratte, D., Wang, B., Dowling, K., Barrow, C.J., & Adhikari, B.P. (2014). Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil. *Food Function*, *5*, 2743–2750. https://doi.org/10.1039/C4FO00296B
9. Farzaneh, H., Ebrahimi Nik, M., Mashreghi, M., Saberi, Z., Jaafari, M.R., & Teymouri, M. (2018). A study on the role of cholesterol and phosphatidylcholine in various features of liposomal doxorubicin: From liposomal preparation to therapy. *International Journal Pharmacological*, *551*, 300–8. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.047

10. Finley, J.W., & Gao, S. (2017). A perspective on *Crocus sativus* L.(Saffron) constituent crocin: a potent water-soluble antioxidant and potential therapy for Alzheimer's disease. *Journal Agriculture Food Chemistry, 65,* 1005–1020. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04398
11. Gaafar, M.R., Mady, R.F., Diab, R.G., & Shalaby, T.I. (2014). Chitosan and silver nanoparticles: promising anti-toxoplasma agents. *Experimental Parasitology, 143*, 30–38. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.05.005
12. Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S. (2019). Hydrogels as drug delivery systems; pros and cons. *Trends in Pharmaceutical Sciences, 5,* 7–24. https://doi.org/10.30476/TIPS.2019.81604.1002
13. Hasibi, F., Nasirpour, A., Varshosaz, J., GarcíaManrique, P., Blanco -López, M.C., Gutiérrez, G., & Matos, M. (2020). Formulation and characterization of Taxifolin - loaded lipid nanovesicles (Liposomes, Niosomes, and Transfersomes) for beverage fortification. *European Journal of Lipid Science and Technology, 122(2)*, 1900105.
14. Horwitz, W. (2004). Offcial methods of analysis of AOAC International, 17thed., Gaithersburg, Maryland.
15. Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., & He, S. (2021). New data content and improved web interfaces. Nucleic Acids Res. *PubChem in 2021:* 49 (D1), D1388–D1395. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971
16. Khazaeli, P., Pardakhty, A., Shoorabi, H. (2007). Caffeine-Loaded Niosomes: Characterization and in Vitro Release Studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 14,* 447–452. https://doi.org/10.1080/10717540701603597
17. Korani, M., Ghaffari, S., Attar, H., Mashreghi, M., & Jaafari, M.R. (2019). Preparation and characterization of nanoliposomal bortezomib formulations and evaluation of their anti-cancer efficacy in mice bearing C26 colon carcinoma and B16F0 melanoma. Nanomedicine Nanotechnology, *Biology and Medicine.* https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.04.016.
18. Liang, R., Chen, L., Yokoyama, W., Williams, P.A., & Zhong, F.(2016). Niosomes consisting of tween-60 and cholesterol improve the chemical stability and antioxidant activity of (−)-epigallocatechin gallate under intestinal tract conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64,* 9180–8. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04147.s001
19. Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release–a review. *International Journal Food Science Technology*, *41*, 1-21. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x
20. Moghassemi, S., & Hadjizadeh, A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. *Journal Control Release*, *185*, 22–36. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.015
21. Mashreghi, M., Karimi, M., Gheybi, F., Zamani, P., Golmohammadzadeh, S., & Darban, S.A. (2020). Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulations of curcumin with high loading efficacy: In vitro and in vivo anti-tumor study. *International Journal of Pharmaceutics, 580,* 119211. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119211
22. Mohajeri, S.A., Hosseinzadeh, H., Keyhanfar, F., & Aghamohammadian, J. (2010). Extraction of crocin from saffron (*Crocus sativus*) using molecularly imprinted polymer solid-phase extraction. *Journal of Separation Science, 33,* 2302–2309. https://doi.org/10.1002/jssc.201000183
23. Momekova, D.B., Gugleva, V.E., & Petrov, P.D. (2021). Nanoarchitectonics of multifunctional niosomes for advanced drug delivery. *ACS Omega., 6,* 33265–33273. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05083
24. Mozafari, M.R, Reed, C.J., Rostron, C., Kocum, C., & Piskin, E. (2002). Construction of stable anionic liposome-plasmid particles using the heating method: a preliminary investigation. *Cellular & Molecular Biology Letters,* 7, 923–8.
25. Naderi, R., Pardakhty, A., Abbasi, M.F., Ranjbar, M., & Iranpour, M. (2021). Preparation and evaluation of crocin loaded in nanoniosomes and their effects on ischemia–reperfusion injuries in rat kidney. *Scientific Reports, 11,* 23525. https://doi.org/10.1038/s41598-021-02073-w
26. Nandhakumar, S., Dhanaraju, M.D., Sundar, V.D., Heera, B. (2017). Influence of surface charge on the in vitro protein adsorption and cell cytotoxicity of paclitaxel loaded poly (ε-caprolactone) nanoparticles. *Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University*, *55*, 249–58. https://doi.org/ 10.1016/j.bfopcu.2017.06.003
27. Parizi, M.H., Sharifi, I., Farajzadeh, S.P., Audacity, A., Parizi, M.H.D., Sharifi, H., Keyhani, A.R., Mostafavi, M., Bamorovat, M., Khosravi, A., & Ghaffari, D. (2019). Tioxolone niosomes exert antileishmanial effects on

leishmania tropica by promoting promastigote apoptosis and immunomodulation. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *12*, 365-374. https://doi.org/10.4103/1995-7645.262566

28. Pamunuwa, G., Karunaratne, V., & Karunaratne, D.(2016) Effect of lipid composition on in vitro release and skin deposition of curcumin encapsulated liposomes. *Journal Nanomater*, https://doi.org/10.101610.1155/2016/4535790
29. Rezvani, M., Hesari, J., Peighambardoust, S.H., Manconi, M., Hamishehkar, H., & Escribano -Ferrer, E. (2019). Potential application of nanovesicles (niosomes and liposomes) for fortification of functional beverages with Isoleucine -Proline -Proline: A comparative study with central composite design approach. *Food Chemistry*, *293*, 368-377. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.015
30. Saleh, A., Pirouzifard, M., & Almasi, H. (2022). Optimization and characterization of *Lippia citriodora* essential oil loaded niosomes: A novel plant-based food nano preservative. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, *650*, 129480. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129480
31. Shilakari Asthana, G., Sharma, P.K., & Asthana, A. (2016). In vitro and in vivo evaluation of niosomal formulation for controlled delivery of clarithromycin. *Scientifica*. https://doi.org/10.1155/2016/6492953
32. Tewabe, A., Abate, A., Tamrie, M., Seyfu, A., & Abdela Siraj, E. (2021). Targeted drug delivery—from magic bullet to nanomedicine: principles, challenges, and future perspectives. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 1711-1724. https://doi.org/10.2147/JMDH.S313968
33. Vignolini, P., Heimler, D., Pinelli, P., Ieri, F., Sciullo, A., & Romani, A. (2008). Characterization of by-products of saffron (*Crocus sativus* L.) production. *Natural Product Communications*, *3*, 1934578X0800301203. https://doi.org/10.1177/1934578X0800301203
34. Yamamoto, Y., Nagasaki, Y., Kato, Y., Sugiyama, Y., & Kataoka, K. (2001). Long-circulating poly (ethylene glycol)–poly (d, l-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *Journal Control Release*, *77*, 27–38. https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00451-5
35. Yeo, P.L., Lim, C.L., Chye, S.M., Ling, APK., & Koh, R.Y. (2017). Niosomes: a review of their structure, properties, methods of preparation, and medical applications. *Asian Biomedicine*, *11*, 301–14. https://doi.org/10.1515/abm-2018-0002